

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/11, A61K 31/713	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/44895
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00244	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MC, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Januar 2000 (29.01.00)	
(30) Prioritätsdaten: 199 03 713.2 30. Januar 1999 (30.01.99) DE 199 56 568.6 24. November 1999 (24.11.99) DE	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: KREUTZER, Roland [DE/DE]; Glotzdorf 26, D-95466 Weidenberg (DE). LIMMER, Stephan [DE/DE]; Leibnizstrasse 14, D-95447 Bayreuth (DE).	
(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelebachstrasse 49 A, D-91052 Erlangen (DE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

(54) Title: METHOD AND MEDICAMENT FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A DEFINED GENE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MEDIKAMENT ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES VORGEgebenEN GENS

(57) Abstract

The invention relates to a medicament containing at least one double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA) designed to inhibit the expression of a target gene. According to the invention, one strand of the dsRNA is at least in part complementary to the target gene.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zum Zielgen ist.

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Verfahren und Medikament zur Hemmung der Expression eines vor-gegebenen Gens

Die Erfindung betrifft Verfahren nach den Oberbegriffen der 5 Ansprüche 1 und 2. Sie betrifft ferner ein Medikament und eine Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide sowie einen dafür kodierenden Vektor.

Ein solches Verfahren ist aus der nachveröffentlichten WO 10 99/32619 bekannt. Das bekannte Verfahren zielt auf die Hemmung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 50 Basen aufweist. Zur Erzielung einer effizienten 15 Hemmung ist eine Länge der identischen Sequenz von 300 bis 1000 Basenpaare erforderlich. Der Herstellungsaufwand eines solchen Oligoribonukleotids ist hoch.

Die DE 196 31 919 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit beson-20 deren Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form ei-nes sie kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-Sinn-RNA handelt es sich um ein RNA-Molekül, das komplementär zu Berei-chen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine 25 Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbe-sondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z.B. Tumorerkrankungen oder viralen Infektionen, eingesetzt werden. - Die Anti-Sinn-RNA muß nachteiligerweise in einer Menge in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß wie die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten Anti-30 Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.

Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fehlge-paarte doppelsträngige RNA (dsRNA) und biologisch aktive fehl-gepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären Komple-

xes mit einem oberflächenaktiven Mittel enthält. Die dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten Nukleinsäureeinzelsträngen ohne definierte Basensequenz. Die Einzelstränge gehen nicht-reguläre, sogenannte "Nicht-Watson-5 Crick"-Basenpaarungen miteinander ein, so daß fehlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die bekannte dsRNA dient zur Hemmung der Vermehrung von Retroviren, wie HIV. Die Vermehrung des Virus kann gehemmt werden, wenn nicht-sequenzspezifische dsRNA in die Zellen eingebracht wird. Es kommt dabei zu einer 10 Induktion von Interferon, wodurch die Virusvermehrung gehemmt werden soll. Der hemmende Effekt bzw. die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist gering.

Aus Fire, A. et.al, NATURE, Vol. 391, pp. 806 ist es bekannt, 15 daß dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, daß die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-20 Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA bzw. durch sie induzierte Enzyme zurückzuführen ist. - Über die Wirksamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der Genexpression, insbesondere in Säugерzellen und humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts 25 ausgesagt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst effizientes Verfahren, Medikament bzw. eine möglichst effiziente Verwendung zur Herstellung eines Medikaments 30 angegeben werden, mit dem/der eine besonders wirksame Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens bewirkbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 37, 38 und 74 und 75 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 3 bis 36, 39 bis 73 und 76 bis 112.

- 5 Nach Maßgabe der verfahrensseitigen Erfindungen ist jeweils vorgesehen, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaare aufweist.

Erfindungsgemäß sind ein Oligoribonukleotid oder ein dafür kodierender Vektor vorgesehen. Das Oligoribonukleotid weist zumindest abschnittsweise eine definierte Nukleotidsequenz auf. Der definierte Abschnitt kann auf den komplementären Bereich I beschränkt sein. Es kann aber auch sein, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid insgesamt eine definierte Nukleotidsequenz aufweist.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs I von höchstens 49 Basenpaaren eine wirksame Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können mit geringerem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.

Insbesondere dsRNA mit einer Länge von mehr als 50 Nukleotidpaaren induziert in Säugerzellen und humanen Zellen bestimmte zelluläre Mechanismen, z.B. die dsRNA-abhängige Proteinkinase oder das 2-5A-System. Das führt zum Verschwinden des durch die eine definierte Sequenz aufweisende dsRNA vermittelten Interferenzeffektes. Dadurch wird die Proteinbiosynthese in der Zelle blockiert. Insbesondere dieser Nachteil wird durch die vorliegende Erfindung beseitigt.

Weiterhin ist die Aufnahme von dsRNA mit kurzer Kettenlänge in die Zelle bzw. in den Zellkern gegenüber längerkettigen dsRNAs deutlich erleichtert.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß die dsRNA oder der Vektor verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA oder der Vektor kann gleichfalls in 5 virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. - Die vorgenannten Merkmale ermöglichen ein Einschleusen der dsRNA bzw. des Vektors in vorgegebene Zielzellen.

10

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal weist die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare auf. Die dsRNA kann also länger als der zum Zielgen komplementäre Bereich I sein. Der komplementäre Bereich I kann endständig angeordnet 15 oder in die dsRNA eingeschaltet sein. Eine solche dsRNA bzw. ein zur Kodierung derselben vorgesehener Vektor können synthetisch bzw. enzymatisch mit gängigen Verfahren hergestellt werden.

20 Das zu hemmende Gen wird zweckmäßigerweise in eukaryontischen Zellen exprimiert. Das Zielgen kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen. Es kann auch in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert werden. Es kann Be- 25 standteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder Viroids sein. - Das vorgeschlagene Verfahren ermöglicht die Herstellung von Mitteln zur Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z.B. Krebs, viral erkrankungen oder Morbus Alzheimer.

30

Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder planzenpathogenes Virus oder Viroid sein. In diesem Fall erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren auch die Bereitstellung von Mitteln zur Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II wird aus 5 zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet.

10 Die Enden der dsRNA können modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Eine Dissoziation tritt insbesondere bei Verwendung niedriger Konzentrationen oder kurzer Kettenlängen auf. Zur besonders wirksamen Hemmung der Dissoziation kann der 15 durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs II durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht werden. - Eine erfindungsgemäße dsRNA, deren Dissoziation vermindert ist, weist eine höhere Stabilität gegen enzymatischen und chemischen Ab- 20bau in der Zelle bzw. im Organismus auf.

Insbesondere bei Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors kann der komplementäre Bereich II aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet wird. Die Nukleotide sind im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau zweckmäßigerweise chemisch modifiziert.

Die chemische Verknüpfung wird zweckmäßigerweise durch eine 30 kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet. Sie kann nach einem besonders vor- teilhaften Ausgestaltungsmerkmal an mindestens einem, vorzugs-

weise an beiden, Ende/n des komplementären Bereichs II hergestellt werden.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, daß die chemische
5 Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind. Die chemische Verknüpfung kann auch durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Purinen benutzte
10 Purinanaloga gebildet werden. Von Vorteil ist es ferner, daß die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet wird. Sie kann außerdem durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet werden.
15

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, daß zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise
20 Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N`-(p-glyoxylbenzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen. Ferner kann die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet werden. Vorzugsweise wird die chemische Verknüpfung an den Enden des
25 doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt.

Die chemische Verknüpfung kann zweckmäßigerweise durch ultraviolettes Licht induziert werden.

30

Die Nukleotide der dsRNA können modifiziert sein. Dies wirkt einer Aktivierung einer von doppelsträngiger RNA abhängigen Proteinkinase, PKR, in der Zelle entgegen. Vorteilhafte Weise ist mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA

in dem komplementären Bereich II durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt. Mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang des komplementären Bereichs II kann auch ein sogenanntes "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring sein. Vorteilhafterweise sind mehrere Nukleotide "locked nucleotides".

Nach einer weiteren besonders vorteilhaften Ausgestaltung ist 10 vorgesehen, daß die dsRNA oder der Vektor an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird. Das Hüllprotein kann vom Polyomavirus abgeleitet sein. Es kann das Hüllprotein das Virus- 15 Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthalten. Die Verwendung derartiger Hüllproteine ist z.B. aus der DE 196 18 797 A1 bekannt, deren Offenbarungshalt hiermit einbezogen wird. - Die vorgenannten Merkmale erleichtert wesentlich das Einführen der dsRNA bzw. des Vektors 20 in die Zelle.

Vorzugsweise ist bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt. Das gebildete 25 Konstrukt ist besonders stabil.

Die dsRNA kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein.- Die Zelle kann eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

30

Es können mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs oder mindestens ein dafür kodierender Vektor in die Zelle eingeführt werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens

zwei verschiedenen Zielgenen ist. Dadurch ist es möglich gleichzeitig die Expression mindestens zwei verschiedener Zielgene zu hemmen. Um die Expression einer von doppelsträngiger RNA abhängigen Proteinkinase, PKR, in der Zelle zu unterdrücken, ist eines der Zielgene vorteilhafte Weise das PKR-Gen. Dadurch kann die PKR-Aktivität in der Zelle wirksam unterdrückt werden.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ferner ein Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist. - Es hat sich überraschend gezeigt, daß eine solche dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in Säugerzellen eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens eine Größenordnung niedriger sind. Das erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung mindestens eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist. - Das vorgeschlagene Medikament weist die vorgenannten Vorteile auf. Durch die Verwendung eines Vektors können insbesondere Herstellungskosten eingespart werden.

Nach einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weist der komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare auf. - Es hat sich überraschenderweise gezeigt,

daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs I von höchstens 49 Basenpaaren eine effiziente Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können mit geringerem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist. - Überraschenderweise eignet sich eine solche dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens. Bei einer Verwendung von dsRNA wird die Hemmung im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide schon bei um eine Größenordnung geringeren Konzentrationen bewirkt. Die erfindungsgemäße Verwendung ermöglicht also die Herstellung besonders wirksamer Medikamente.

20

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung eines Vektors zur Kodierung mindestens eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA einen zu diesem Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist. - Die Verwendung eines Vektors ermöglicht eine besonders wirksame Gentherapie.

30 Hinsichtlich vorteilhafter Ausgestaltungen des Medikaments und der Verwendung wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

Nachfolgend werden anhand der Figuren Ausführungsbeispiele der Erfindung näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 die schematische Darstellung eines Plasmids für
5 die *in vitro*-Transkription mit T7- und SP6-
Polymerase,
- 10 Fig. 2 RNA nach Elektrophorese auf einem 8%igen Po-
lyacrylamidgel und Ethidiumbromidfärbung,
- Fig. 3 eine Darstellung radioaktiver RNA-Transkripte
nach Elektrophorese auf einem 8%igen Polyacryla-
midgel mit 7 M Harnstoff mittels eines "Instant
Imagers" und
- 15 Fig. 4 a - e Texas-Rot- und YFP-Fluoreszenz in murinen Fibro-
blasten.

Ausführungsbeispiel 1:

20 Die Inhibition der Transkription wurde durch sequenzhomologe
dsRNA in einem *in vitro*-Transkriptionssystem mit einem Kern-
extrakt aus humanen HeLa-Zellen nachgewiesen. Die DNA-Matrize
für diesen Versuch war das mittels *Bam*HI linearisierte Plasmid
pCMV1200.

25

Herstellung der Matrizenplasmide:

Zur Verwendung bei der enzymatischen Synthese der dsRNA wurde
das in Fig. 1 dargestellte Plasmid konstruiert. Dazu wurde
zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der "positi-
30 ve control DNA" des HeLaScribe[®] Nuclear Extract *in vitro* Tran-
skriptionskits der Firma Promega, Madison, USA als DNA-Matrize
durchgeführt. Einer der verwendeten Primer enthielt die Se-
quenz einer *Eco*RI-Schnittstelle und des T7-RNA-Polymerase-
Promotors gemäß Sequenzprotokoll Nr. 1. Der andere Primer ent-

hielt die Sequenz einer *Bam*HI-Schnittstelle und des SP6-RNA-Polymerase-Promotors gemäß Sequenzprotokoll Nr. 2. Darüber hinaus wiesen beide Primer an ihren 3'-Enden identische bzw. komplementäre Bereiche zur DNA-Matrize auf. Die PCR wurde mittels des "Taq PCR Core Kits" der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland nach Herstellerangaben durchgeführt. In einem Volumen von 100 μ l wurden 1,5 mM MgCl₂, je 200 μ M dNTP, je 0,5 μ M Primer, 2,5 U Taq-DNA-Polymerase und etwa 100 ng "positive control DNA" als Matrize in PCR-Puffer eingesetzt. Nach der anfänglichen Denaturierung der Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 94°C für 5 Minuten erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen von je 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Annealing bei 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Primer und 1,5 - 2 Minuten Polymerisation bei 72°C. Nach einer Schlußpolymerisation von 5 Minuten bei 72°C wurden 5 μ l des Reaktionsansatzes durch Agarosegelektrophorese analysiert. Die Länge des so amplifizierten DNA-Fragmentes betrug 400 Basenpaare, wobei 340 Basenpaare der "positive control DNA" entsprachen. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit EcoRI und *Bam*HI hydrolysiert und nach erneuter Aufreinigung zur Ligation mit einem ebenfalls durch EcoRI und *Bam*HI hydrolysierten pUC18 Vektor eingesetzt. Es erfolgte Transformation von *E. coli* XL1-blue. Das erhaltene Plasmid (pCMV5) trägt ein DNA-Fragment, das am 5'-Ende von dem T7- und am 3'-Ende von dem SP6-Promotor flankiert wird. Durch Linearisierung des Plasmids mit *Bam*HI kann es *in vitro* mit der T7-RNA-Polymerase zur *run-off*-Transkription einer 340 Nukleotide langen, in Sequenzprotokoll Nr. 3 dargestellten, einzelsträngigen RNA eingesetzt werden. Wird das Plasmid mit EcoRI linearisiert, kann es zur *run-off*-Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase eingesetzt werden, wobei der komplementäre Strang entsteht. Entsprechend dem zuvor dargestellten Verfahren wurde auch eine 23 Nukleotide längere RNA synthetisiert. Dazu wurde eine in Sequenzprotokoll

Nr. 4 dargestellte DNA über die *Eco*RI und *Bam*HI-Schnittstellen mit dem pUC18 Vektor ligiert.

Als DNA-Matrize für die in vitro-Transkription mit HeLa-5 Kernextrakt wurde das Plasmid pCMV1200 konstruiert. Dazu wurde ein 1191 bp großes *Eco*RI/*Bam*HI-Fragment der im HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro Transkriptionskit enthaltenen Positivkontroll-DNA mittels PCR amplifiziert. Das amplifizierte 10 Fragment umfaßt den 828 bp großen "unmittelbar frühen" CMV-Promotor und ein 363 bp großes transkribierbares DNA-Fragment. Das PCR-Produkt wurde über "T-Überhang"-Ligation mit dem Vektor pGEM-T ligiert. Am 5'-Ende des Fragments ist eine *Bam*HI-Schnittstelle. Das Plasmid wurde durch Hydrolyse mit *Bam*HI linearisiert und als Matrize zur run-off-Transkription einge-15 setzt.

in vitro-Transkription der komplementären Einzelstränge:

pCMV5-Plasmid-DNA wurde mit *Eco*RI bzw. *Bam*HI linearisiert. Sie wurde als DNA-Matrize für eine in vitro-Transkription der kom-20 plementären RNA-Einzelstränge mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase verwendet. Dazu wurde das "Riboprobe in vitro Transcription" System der Firma Promega, Madison, USA eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurden 2 µg linearisierte Plasmid-DNA in 100 µl Transkriptionspuffer und 40 U T7- oder SP6-RNA-Polymerase 5 -25 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Matrize durch Zugabe von 2,5 µl RNase-freier DNase RQ1 und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C abgebaut. Der Transkriptions-ansatz wurde mit H₂O auf 300 µl aufgefüllt und durch Phenolex-30 traktion gereinigt. Die RNA wurde durch Zugabe von 150 µl 7 M Ammoniumacetat und 1125 µl Ethanol gefällt und bis zur Hybri-disierung bei -65°C aufbewahrt.

Herstellung der RNA-Doppelstränge:

Zur Hybridisierung wurden 500 μ l der in Ethanol aufbewahrten und gefällten einzelsträngigen RNA abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde getrocknet und in 30 μ l PIPES-Puffer, pH 6,4 in Gegenwart von 80 % Formamid, 400 mM NaCl und 1 mM EDTA 5 aufgenommen. Jeweils 15 μ l der komplementären Einzelstränge wurden zusammengegeben und für 10 Minuten auf 85°C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze bei 50°C über Nacht inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt.

- 10 Bei der Hybridisierung wurden nur annähernd äquimolare Mengen der beiden Einzelstränge eingesetzt. Dadurch enthielten die dsRNA-Präparationen einzelsträngige RNA (ssRNA) als Kontamination. Um diese ssRNA-Kontaminationen zu entfernen, wurden die Ansätze nach der Hybridisierung mit den einzelstrangspezifischen 15 Ribonukleasen RNase A aus Rinderpankreas und RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* behandelt. RNase A ist eine für Pyrimidine spezifische Endoribonuklease. RNase T1 ist eine Endoribonuklease, die bevorzugt auf der 3'-Seite von Guanosinen schneidet. dsRNA ist kein Substrat für diese Ribonukleasen.
- 20 Für die RNase-Behandlung wurde zu den Ansätzen in 300 μ l Tris, pH 7,4, 300 mM NaCl und 5 mM EDTA 1,2 μ l RNaseA in einer Konzentration von 10 mg/ml und 2 μ l RNaseT1 in einer Konzentration von 290 μ g/ml zugegeben. Die Ansätze wurden 1,5 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurden die RNasen durch Zugabe von 5 μ l 25 Proteinase K in einer Konzentration von 20 mg/ml sowie 10 μ l 20%iges SDS und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C denaturiert. Die dsRNA wurde durch Phenol-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Um die Vollständigkeit des RNase-Verdaus überprüfen zu können, wurden zwei Kontrollansätze mit ssRNA 30 analog zu den Hybridisierungsansätzen behandelt.

Das getrocknete Pellet wurde in 15 μ l TE-Puffer, pH 6,5 aufgenommen und auf einem 8%igen Gel einer nativen Polyacrylamidgelektrophorese unterzogen. Das Acrylamidgel wurde anschlie-

ßend in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und in einem Was-
serbad gespült. Fig. 2 zeigt die auf einem UV-Transilluminator
sichtbar gemachte RNA. Die auf Spur 1 aufgetragene *sense*- und
die auf Spur 2 aufgetragene *antisense*-RNA zeigten unter den
5 gewählten Bedingungen ein anderes Laufverhalten als die auf
Spur 3 aufgetragene dsRNA des Hybridisierungsansatzes. Die auf
den Spuren 4 bzw. 5 aufgetragene RNase-behandelte *sense*- bzw
antisense-RNA erzeugte keine sichtbare Bande. Dies zeigt, daß
die einzelsträngigen RNAs vollständig abgebaut wurden. Die auf
10 Spur 6 aufgetragene RNase-behandelte dsRNA des Hybridisie-
rungsansatzes ist resistent gegenüber der RNase-Behandlung.
Die im nativen Gel im Vergleich zu der auf Spur 3 aufgetrage-
nen dsRNA schneller wandernde Bande resultiert aus dsRNA, die
frei von ssRNA ist. Neben der dominierenden Hauptbande treten
15 nach der RNase-Behandlung schwächere, schneller wandernde Ban-
den auf.

in vitro-Transkriptions-Test mit menschlichem Zellkerrextrakt:

Unter Verwendung des HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro
20 Transkriptionskits der Firma Promega, Madison, USA wurde die
Transkriptionseffizienz des oben angegebenen, im Plasmid
pCMV1200 enthaltenen, zur "positive control DNA" homologen
DNA-Fragments in Gegenwart der sequenzhomologen dsRNA
(dsRNA-CMV5) bestimmt. Außerdem wurde der Einfluß der nicht-
25 sequenzhomologen, dem "Gelb fluoreszierenden Protein" (YFP)-
Gen entsprechenden dsRNA (dsRNA-YFP) untersucht. Diese dsRNA
war analog zur sequenzhomologen dsRNA hergestellt worden. Die
Sequenz eines Stranges dieser dsRNA ist Sequenzprotokoll Nr. 5
zu entnehmen. Als Matrize für die *run-off*-Transkription diente
30 das Plasmid pCMV1200. Es trägt den "unmittelbar frühen" Promo-
tor des Cytomegalievirus, der von der eukaryotischen RNA-
Polymerase II erkannt wird, und ein transkribierbares DNA-
Fragment. Die Transkription erfolgte mittels des HeLa-
Kerrextrakts, der alle notwendigen Proteine für eine Tran-

skription enthält. Durch Zugabe von [\cdot - 32 P]rGTP zum Transkriptionsansatz wurde radioaktiv markiertes Transkript erhalten. Das verwendete [\cdot - 32 P]rGTP hatte eine spezifische Aktivität von 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. Pro Ansatz wurden 3 mM MgCl₂, je 5 400 μ M rATP, rCTP, rUTP, 16 μ M rGTP, 0,4 μ M [\cdot - 32 P]rGTP und je nach Versuch 1 fmol linearisierte Plasmid-DNA und verschiedene Mengen an dsRNA in Transkriptionspuffer eingesetzt. Jeder Ansatz wurde mit H₂O auf ein Volumen von 8,5 μ l aufgefüllt. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt. Zum Starten der Transkription 10 wurden 4 U HeLa-Kernextrakt in einem Volumen von 4 μ l zugegeben und für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 87,5 μ l auf 30°C erwärmten Stopp-Mix beendet. Zur Entfernung der Proteine wurden die Ansätze mit 15 100 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v), gesättigt mit TE-Puffer, pH 5,0, versetzt und 1 Minute kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde etwa 1 Minute bei 12000 rpm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu jedem Ansatz wurden 250 μ l Ethanol zugegeben. Die Ansätze wurden gut gemischt und für mindestens 15 Minuten 20 auf Trockeneis/Methanol inkubiert. Zur Präzipitation der RNA wurden die Ansätze 20 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 15 Minuten im Vakuum getrocknet und in 10 μ l H₂O resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurden 10 μ l denaturierender Probenpuffer 25 zugegeben. Die Trennung des freien GTP vom entstandenen Transkript erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem 8%igen Gel mit 7 M Harnstoff. Die bei der Transkription mit HeLa-Kernextrakt gebildeten RNA-Transkripte in denaturierendem Probenpuffer wurden für 10 Minuten 30 auf 90°C erhitzt und 10 μ l davon sofort in die frisch gespülten Probentaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA. Die Menge der bei der Transkription gebildeten radioaktiven ssRNA wurde nach der Elektrophorese mit Hilfe eines *Instant Imager* analysiert.

Fig. 3 zeigt die mittels des *Instant Imagers* dargestellte radioaktive RNA aus einem repräsentativen Tests. Es wurden aus folgenden Transkriptionsansätzen gewonne Proben aufgetragen:

5

Spur 1: ohne Matrizen-DNA, ohne dsRNA;
Spur 2: 50 ng Matrizen-DNA, ohne dsRNA;
Spur 3: 50 ng Matrizen-DNA, 0,5 μ g dsRNA-YFP;
Spur 4: 50 ng Matrizen-DNA, 1,5 μ g dsRNA-YFP;
10 Spur 5: 50 ng Matrizen-DNA, 3 μ g dsRNA-YFP;
Spur 6: 50 ng Matrizen-DNA, 5 μ g dsRNA-YFP;
Spur 7: ohne Matrizen-DNA, 1,5 dsRNA-YFP;
Spur 8: 50 ng Matrizen-DNA, ohne dsRNA;
Spur 9: 50 ng Matrizen-DNA, 0,5 μ g dsRNA-CMV5;
15 Spur 10: 50 ng Matrizen-DNA, 1,5 μ g dsRNA-CMV5;
Spur 11: 50 ng Matrizen-DNA, 3 μ g dsRNA-CMV5;
Spur 12: 50 ng Matrizen-DNA, 5 μ g dsRNA-CMV5;

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von sequenzhomologer dsRNA im Vergleich zum Kontrollansatz ohne dsRNA sowie auch zu den Ansätzen mit nicht-sequenzhomologer dsRNA-YFP. Die Positivkontrolle in Spur 2 zeigt, daß bei der *in vitro*-Transkription mit HeLa-Kernextrakt radioaktives Transkript gebildet wurde. Der Ansatz dient zum Vergleich mit den Transkriptionsansätzen, die in Gegenwart von dsRNA inkubiert worden waren. Die Spuren 3 bis 6 zeigen, daß die Zugabe von nicht-sequenzspezifischer dsRNA-YFP keinen Einfluß auf die Menge des gebildeten Transkripts hat. Die Spuren 9 bis 12 zeigen, daß die Zugabe einer zwischen 1,5 und 3 μ g liegenden Menge sequenzspezifischer dsRNA-CMV5 zu einer Abnahme der gebildeten Transkript-Menge führt. Um auszuschließen, daß die beobachteten Effekte nicht auf der dsRNA, sondern auf einer möglicherweise bei der Herstellung der dsRNA unabsichtlich mitgeführten Kontamination beruhen, wurde eine

weitere Kontrolle durchgeführt. Einzelstrang-RNA wurde wie oben beschrieben transkribiert und anschließend der RNase-Behandlung unterzogen. Mittels nativer Polyacrylamidgelektrophorese konnte gezeigt werden, daß die ssRNA vollständig abgebaut worden war. Dieser Ansatz wurde wie die Hybridisierungsansätze einer Phenolextraktion und einer Ethanolfällung unterzogen und anschließend in TE-Puffer aufgenommen. Auf diese Weise wurde eine Probe erhalten, die keine RNA enthielt, aber mit den gleichen Enzymen und Puffern behandelt worden war wie die dsRNA. Spur 8 zeigt, daß der Zusatz dieser Probe keinen Einfluß auf die Transkription hatte. Die Abnahme des Transkripts bei Zugabe sequenzspezifischer dsRNA kann deshalb eindeutig der dsRNA selbst zugeschrieben werden. Die Reduzierung der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA bei einem menschlichen Transkriptionssystem zeigt eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

20 **Ausführungsbeispiel 2:**

Als Testsystem für diese *in vivo*-Experimente diente die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3, ATCC CRL-1658. Mit Hilfe der Mikroinjektion wurde das YFP-Gen in die Zellkerne eingebracht. Die Expression des YFP wurde unter dem Einfluß gleichzeitig mittransfizierter sequenzhomologer dsRNA untersucht. Diese dsRNA-YFP ist über eine Länge von 315 bp zum 5'-Bereich des YFP-Gens homolog. Die Nukleotidsequenz eines Strangs der dsRNA-YFP ist in Sequenzprotokoll Nr. 5 wiedergegeben. Die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte 3 Stunden nach Injektion anhand der grün-gelben Fluoreszenz des gebildeten YFP.

Konstruktion des Matrizenplasmids und Herstellung der dsRNA:

Als Matrize für die Herstellung der YFP-dsRNA mittels T7- und SP6-*in vitro*-Transkription wurde ein Plasmid nach dem gleichen Prinzip wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben konstruiert.

5 Das gewünschte Genfragment wurde unter Verwendung des Primers *Eco_T7_YFP* gemäß Sequenzprotokoll Nr. 6 und *Bam_SP6_YFP* gemäß Sequenzprotokoll Nr. 7 mittels PCR amplifiziert und analog zu der obigen Beschreibung zur Herstellung der dsRNA verwendet. Die erhaltene dsRNA-YFP ist identisch mit der in Ausführungs-
10 beispiel 1 als nicht-sequenzspezifische Kontrolle verwendeten dsRNA.

Es wurde eine am 3'-Ende der RNA gemäß Sequenzprotokoll Nr. 8 über eine C18-Linkergruppe chemisch mit dem 5'-Ende der kom-
15 plementären RNA verknüpfte dsRNA (L-dsRNA) hergestellt. Dazu wurden mit Disulfid-Brücken modifizierte Synthonen verwendet. Das 3'-terminale Synthon ist über den 3'-Kohlenstoff mit einer aliphatischen Linker-Gruppe über eine Disulfidbrücke an den festen Träger gebunden. Bei dem zum 3'-terminalen Synthon des
20 einen Oligoribonukleotids komplementären 5'-terminalen Synthon des komplementären Oligoribonukleotids ist die 5'-Tritylschutzgruppe über einen weiteren aliphatischen Linker und eine Disulfidbrücke gebunden. Nach Synthese der beiden Einzelstränge, Entfernen der Schutzgruppen und Hybridisierung
25 der komplementären Oligoribonukleotide gelangen die entstehenden Thiolgruppen in räumliche Nachbarschaft zueinander. Durch Oxidation werden die Einzelstränge über ihre aliphatischen Linker und eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Anschließend erfolgt Reinigung mit Hilfe der HPLC.

30

Vorbereitung der Zellkulturen:

Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % fötalem Rinderserum unter 7,5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C in Kulturschalen inkubiert und vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Das

Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsin/EDTA. Zur Vorbereitung der Mikroinjektion wurden die Zellen in Petrischalen überführt und bis zu Bildung von Mikrokolonien weiter inkubiert.

5 Mikroinjektion:

Die Kulturschalen wurde zur Mikroinjektion für ca. 10 Minuten aus dem Inkubator genommen. Es wurde in ca. 50 Zellkerne pro Ansatz innerhalb eines markierten Bereichs unter Verwendung des Mikroinjektionssystems AIS der Firma Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland einzeln injiziert. Anschließend wurden die Zellen weitere drei Stunden inkubiert. Für die Mikroinjektion wurden Borosilikat-Glaskapillaren der Firma Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland mit einem Spitzendurchmesser unter 0,5 μm vorbereitet. Die Mikroinjektion wurde mit einem Mikromani-pulator der Firma Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan durchgeführt. Die Injektionsdauer betrug 0,8 Sekunden, der Druck ca. 100 hPa. Für die Transfektion wurde das Plasmid pCDNA-YFP verwendet, das ein ca. 800 bp großes *Bam*HI/*Eco*RI-Fragment mit dem Gen des YFP im Vektor pcDNA3 enthält. Die in die Zellkerne injizierten Proben enthielten 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pCDNA-YFP sowie an Dextran-70000 gekoppeltes Texas-Rot in 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KPO₄, pH 7,5. Zusätzlich wurden ca. 100 pl RNA mit einer Konzentration von 1 μM , bzw. 375 μM im Fall der L-dsRNA, zugegeben.

25

Die Zellen wurden bei Anregung mit Licht der Anregungswellenlänge von Texas-Rot, 568 nm, bzw. von YFP, 488 nm, mittels eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Einzelne Zellen wurden mittels einer digitalen Kamera dokumentiert. Die Figuren 4 a - 30 e zeigen das Ergebnis für NIH3T3-Zellen. Bei den in Fig. 4 a gezeigten Zellen ist *sense*-YFP-ssRNA, in Fig. 4 b *antisense*-YFP-ssRNA, in Fig. 4 c dsRNA-YFP, in Fig. 4 d keine RNA und in Fig. 4 e L-dsRNA injiziert worden.

Das jeweils linke Feld zeigt die Fluoreszenz von Zellen, die mit 568 nm angeregt wurden. Rechts ist die Fluoreszenz derselben Zellen bei Anregung mit 488 nm zu sehen. Die Texas-Rot-Fluoreszenz aller dargestellten Zellen zeigt, daß die Injektionslösung erfolgreich in die Zellkerne appliziert wurde und getroffene Zellen nach drei Stunden noch lebendig waren. Abgestorbene Zellen zeigten keine Texas-Rot-Fluoreszenz mehr.

Die jeweils rechten Felder der Figuren 4 a und 4 b zeigen, daß die Expression des YFP bei Injektion der einzelsträngigen RNA in die Zellkerne nicht sichtbar inhibiert wurde. Das rechte Feld der Fig. 4 c zeigt Zellen, deren YFP-Fluoreszenz nach Injektion von dsRNA-YFP nicht mehr nachweisbar war. Fig. 4 d zeigt als Kontrolle Zellen, in die keine RNA injiziert worden war. Die in Fig. 4 e dargestellte Zelle zeigt durch die Injektion der L-dsRNA, die zum YFP-Gen sequenzhomologe Bereiche aufweist, eine nicht mehr nachweisbare YFP-Fluoreszenz. Dieses Ergebnis belegt, daß auch kürzere dsRNAs zur spezifischen Inhibition der Genexpression bei Säugern verwendet werden können, wenn die Doppelstränge durch chemische Verknüpfung der Einzelstränge stabilisiert werden.

Literatur:

- Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M. (1999). Photoregulation der Bildung und Dissoziation eines DNA-Duplexes durch *cis-trans*-Isomerisierung einer Azobenzoleinheit. *Angew. Chem.* **111**, 2547-2549.
- Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Urtti, A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of double helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4954-4961.
- Castelli, J., Wood, K.A. & Youle, R.J. (1998). The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 386-390.
- Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Oretskaya, T.S., Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M. & Shabarova, Z.A. (1993). Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5403-5407.
- Expert-Bezancon, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983). Precise localization of several covalent RNA-RNA cross-link in *Escherichia coli* 16S RNA. *Eur. J. Biochem.* **136**, 267-274.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

- Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F. (1995). Circulaiza-
tion of oligonucleotides by disulfide bridge formation.
Nucl. Acids Res. **23**, 2025-2029.
- 5 Gryaznov, S.M. & Letsinger, R.L. (1993). Template controlled
coupling and recombination of oligonucleotide blocks con-
taining thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1403-
1408.
- 10 Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein
kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for
an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11693-11695.
- 15 Lipson, S.E. & Hearst, J.E. (1988). Psoralen cross-linking of
ribosomal RNA. In *Methods in Enzymology* Anonymous pp.
330-341.
- 20 Liu, Z.R., Sargueil, B. & Smith, C.W. (1998). Detection of a
novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice
site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene blue-
mediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6910-
6920.
- 25 Micura, R. (1999). Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solid-
phase synthesis. *Chem. Eur. J.* **5**, 2077-2082.
- 30 Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehres-
mann, C. (1996). Psoralen crosslinking between human im-
munodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA₃^{Lys}. *Nucl.*
Acids Res. **24**, 509-514.

Wang, S. & Kool, E.T. (1994). Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2326-2333.

5 Wang, Z. & Rana, T.M. (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* **35**, 6491-6499.

Watkins, K.P. & Agabian, N. (1991). *In vivo* UV cross-linking 10 of U snRNAs that participate in trypanosome trans-splicing. *Genes & Development* **5**, 1859-1869.

Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* **32**, 301-310.

Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. & Brimacombe, R. 15 (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids Res.* **5**, 2705-2720.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
10
2. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein Vektor zur Kodierung mindestens eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zum Zielgen komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
15
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA oder der Vektor in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
20
- 25 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oder der Vektor in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich II aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert sind.
5
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
10
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs II durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
15
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stape-lungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.
20
- 25 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs II hergestellt wird.
- 30 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet wird.
5
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet wird.
10
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.
15
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
20
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.
25
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
30
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der

dsRNA in dem komplementären Bereich II durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.

5 28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang des komplementären Bereichs II ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.

10

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oder der Vektor an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.

15

30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

20

31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

25

32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

30

33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

34. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 5 35. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs oder mindestens ein dafür kodierender Vektor in die Zelle einge-führt werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von minde-stens zwei verschiedenen Zielgenen ist.
- 10 36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eines der Zielgene das PKR-Gen ist.
- 15 37. Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Express-ion eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komple-mentären Bereich I aufweist.
- 20 38. Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung min-destens eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorge-gebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist.
- 25 39. Medikament nach Anspruch 37 oder 38, wobei die dsRNA oder der Vektor verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 30 40. Medikament nach Anspruch 37 oder 38, wobei die dsRNA oder der Vektor in virale natürliche Kapside oder in auf che-mischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche

Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.

41. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 40, wobei
5 dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.
42. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 41, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
10
43. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 42, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
- 15 44. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 43, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmoidien, exprimierbar ist.
45. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 44, wobei das
20 Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
46. Medikament nach Anspruch 45, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 25 47. Medikament nach Anspruch 45, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
48. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 47, wobei die
30 dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
49. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 48, wobei der komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

50. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 49, wobei ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkular ausgebildeten, topologisch geschlossenen, RNA-Einzelstrangs gebildet ist.
5
51. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 50, wobei der komplementäre Bereich II aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet ist.
10
52. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 51, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert ist.
15
53. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 52, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
20
54. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 53, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs II durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.
25
55. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 54, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stape-lungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenko-ordination gebildet ist.
30

56. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 55, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs II hergestellt ist.

5

57. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 56, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.

10

58. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 57, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Purinen benutzte Purinanaloge gebildet ist.

15

59. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 58, wobei die chemische Verknüpfung durch in die komplementären Bereiche II eingeschaltete Azabenzoleinheiten gebildet ist.

20

60. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 59, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloge gebildet ist.

25

61. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 60, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

30

62. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 61, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträn-

gigen Bereichs vorgesehene Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.

63. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 62, wobei die 5 chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Tripelhelix-Bindungen sind.
64. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 63, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA 10 in dem komplementären Bereich II durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
65. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 64, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang des komplementären Bereichs II ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, 15 chemisch modifizierten Zuckerring ist.
66. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 65, wobei die 20 dsRNA oder der Vektor an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.
67. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 66, wobei das 25 Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
68. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 67, wobei das 30 Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
69. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 68, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem

Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

70. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 69, wobei die
5 dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
71. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 70, wobei die
10 Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
72. Medikament nach einem der Ansprüche 37 bis 71, wobei darin mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs oder
15 mindestens ein dafür kodierender Vektor enthalten sind, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.
73. Medikament nach Anspruch 72, wobei eines der Zielgene das
20 PKR-Gen ist.
74. Verwendung eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei
25 ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist.
75. Verwendung eines Vektors zur Kodierung mindestens eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der
30 dsRNA einen zu diesem Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist.

76. Verwendung nach Anspruch 74 oder 75, wobei die dsRNA oder der Vektor verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.

5 77. Verwendung nach Anspruch 74 oder 75, wobei die dsRNA oder der Vektor in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.

10

78. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 77, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare aufweist.

15

79. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 78, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.

20

80. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 79, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.

25

81. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 80, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmoiden, exprimierbar ist.

82.

Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 81, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

30

83. Verwendung nach Anspruch 82, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

84.

Verwendung nach Anspruch 82, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

85. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 84, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
86. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 85, wobei ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbstkomplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet ist.
87. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 86, wobei der komplementäre Bereich II aus selbstkomplementären Bereichen einer RNA-Haarnadelschleife gebildet wird.
88. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 87, wobei die Nukleotide im Schleifenbereich zwischen der doppelsträngigen Struktur zum Schutz vor Abbau chemisch modifiziert sind.
89. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 88, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
90. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 89, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs II durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.
91. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 90, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stape-

lungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenko-ordination gebildet ist.

92. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 91, wobei die
5 chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs II hergestellt ist.
93. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 92, wobei die
10 chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.
- 15 94. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 93, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet ist.
- 20 95. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 94, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet ist.
- 25 96. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 95, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.
- 30 97. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 96, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

98. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 97, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
5
99. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 98, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.
10
100. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 99, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in dem komplementären Bereich II durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
15
101. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 100, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang des komplementären Bereichs II ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.
20
102. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 101, wobei die dsRNA oder der Vektor an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.
25
103. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 102, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
30
104. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 103, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

105. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 104, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder 5 kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
106. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 105, wobei die dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
107. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 106, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
108. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 107, wobei mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs oder mindestens ein dafür kodierender Vektor verwendet werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.
109. Verfahren nach Anspruch 108, wobei eines der Zielgene das PKR-Gen ist.
110. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 109, wobei das Medikament in die Blutbahn oder das Interstitium des zu therapiierenden Organismus injizierbar ist.
111. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 110, wobei die dsRNA bzw. der sie kodierende Vektor in Bakterien oder 30 Mikroorganismen aufgenommen sind.

112. Verwendung nach einem der Ansprüche 74 bis 111, wobei der komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

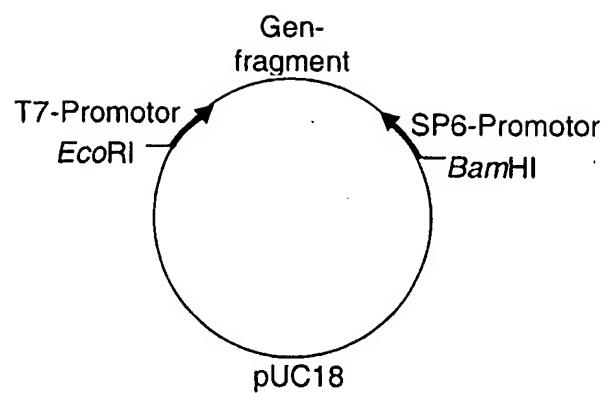


Fig. 1

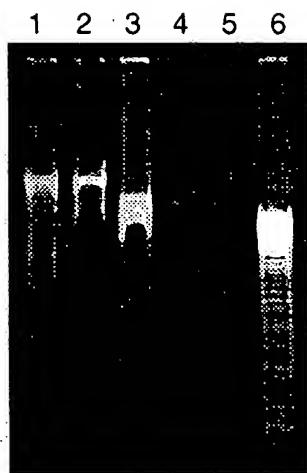


Fig. 2

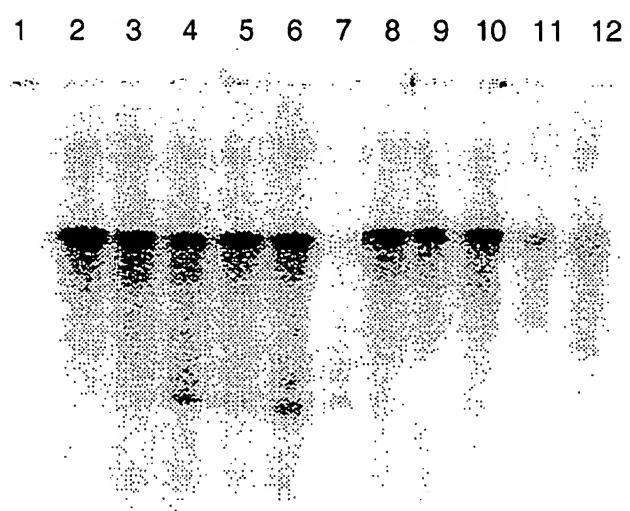


Fig. 3

Fig. 4 a

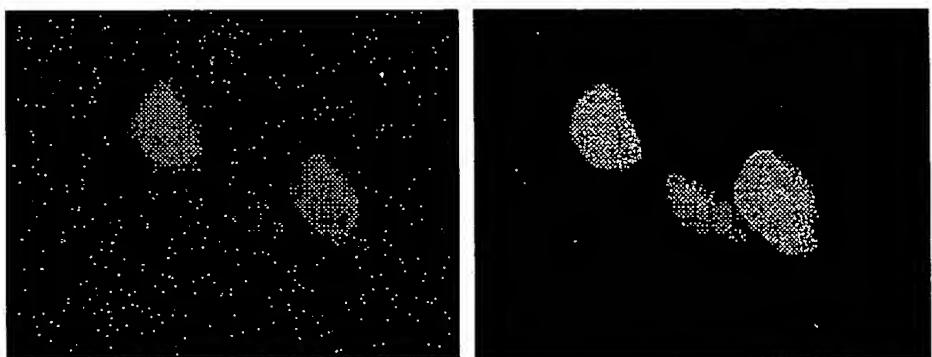


Fig. 4 b

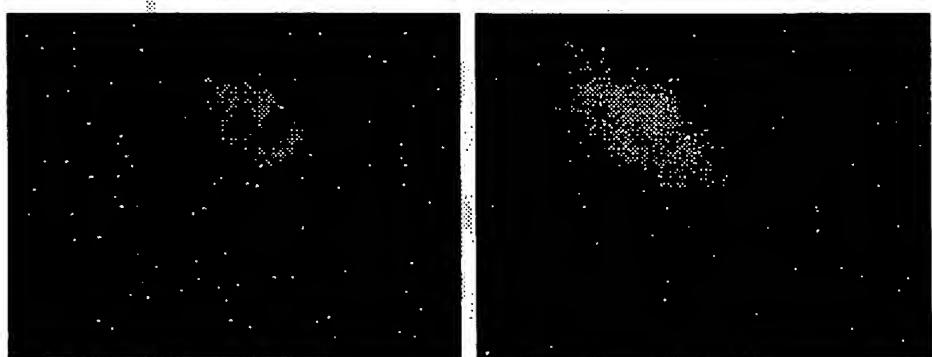


Fig. 4 c

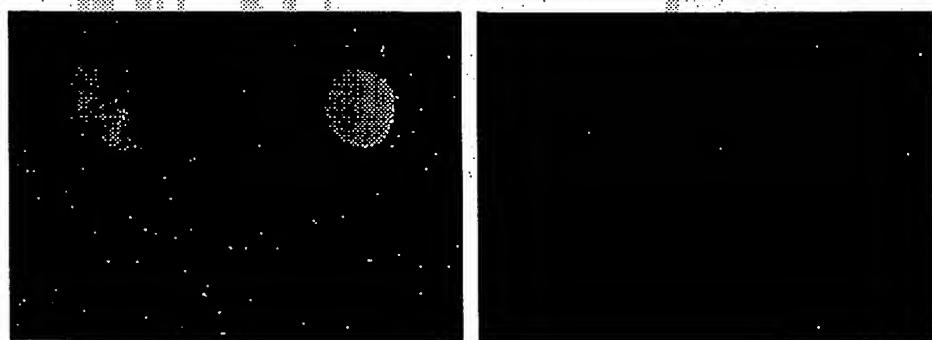


Fig. 4 d

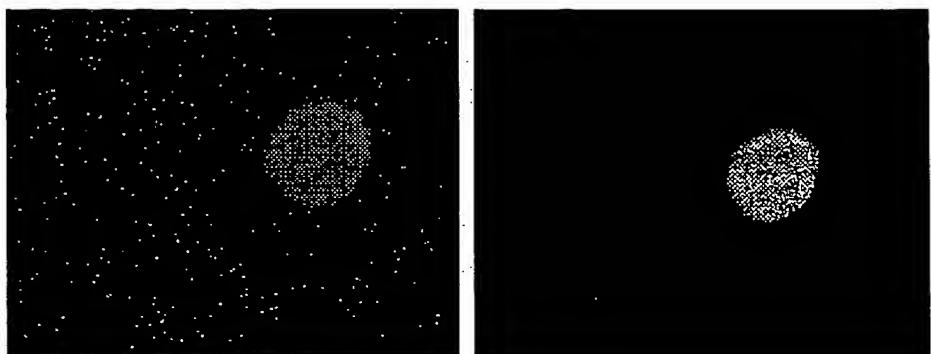
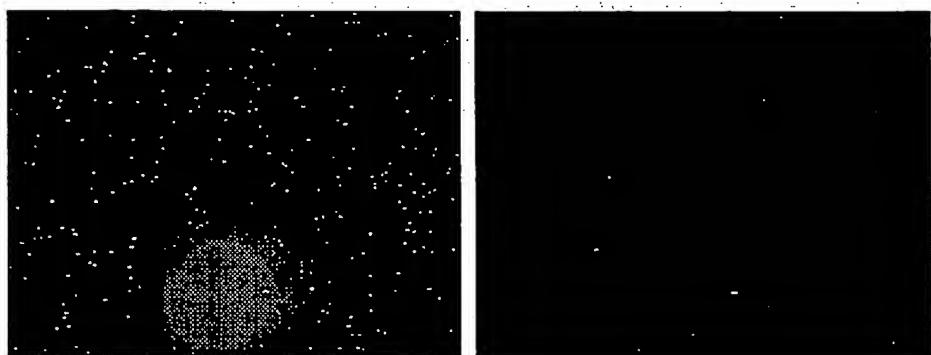


Fig. 4 e



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Kreutzer Dr., Roland
Limmer Dr., Stephan

5

<120> Verfahren und Medikament zur Hemmung der Expression
eines vorgegebenen Gens

<130> 400968

10

<140>
<141>

<150> 199 03 713.2

15 <151> 1999-01-30

<150> 199 56 568.6

<151> 1999-11-24

20 <160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

EcoRI-Schnittstelle, T7-RNA-Polymerasepromotor

<400> 1

ggaattctaa tacgactcac tatagggcga tcagatctct agaag

45

35

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
BamHI-Schnittstelle, SP6-RNA-Polymerasepromotor

5 <400> 2

gggatccatt tagtgacac tatagaatac ccatgatcgc gtagtcgata

50

<210> 3

10 <211> 340

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: RNA, die
einer Sequenz aus der "positive control DNA" des
HeLaScribe Nuclear Extract in vitro
Transkriptionskits der Firma Promega entspricht

20 <400> 3

ucagaucucu agaagcuuua augcggagu uuaucacagu uaaaauugcu aacgcagucag 60
gcaccgugua ugaaaucuaa caaugcguc aucgucaucc ucggcaccgu cacccuggau 120
gcuguaggca uaggcuuggu uaugccggua cugccgggccc ucuugcggga uaucguccau 180
uccgacagca ucgccaguca cuauggcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcaauuu 240
25 cuaugcgcac ccguucucgg agcacugucc gaccgcuuug gccgcccggccc aguccugcuc 300
gcuucgcuac uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg 340

<210> 4

30 <211> 363

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA, die
einer Sequenz aus der "positive control DNA" des
HeLaScribe Nuclear Extract in vitro
Transkriptionskits der Firma Promega entspricht

40 <400> 4

tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60

gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgcctc atcgcatcc tcggcaccgt caccctggat 120
gctgttaggca taggctggta tatgccggta ctgccggcc tcttgcggga tatcgccat 180
tccgacagca tcgcccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240
ctatgcgcac ccgttctcggt agcaactgtcc gaccgcttg gccggccgccc agtcctgctc 300
5 gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg 360
atc 363

<210> 5
10 <211> 315
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus
dem YFP-Gen

<400> 5
auggugagca agggcgagga gcuguucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac 60
20 ggccgacguaa acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgaggcgaa ugccaccuac 120
ggcaagcuga cccugaaguu caucugcacc accggcaagc ugcccugcc cuggccacc 180
cucgugacca cccugaccua cggcgugcag ugcuucagcc gcuaccccgaa ccacaugaag 240
cagcacgacu ucuucaaguc cgccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccacuuc 300
uucaaggacg acggc 315
25

<210> 6
<211> 52
<212> DNA
30 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
ECORI-Schnittstelle, T7-RNA-Polymerasepromotor,
35 komplementärer Bereich zum YFP-Gen

<400> 6
ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc 52
40
<210> 7

<211> 53
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
BamHI-Schnittstelle, SP6-RNA-Polymerasepromotor,
komplementärer Bereich zum YFP-Gen

10 <400> 7
gggatccatt taggtgacac tatagaatac gccgtcgcc ttgaagaaga tgg 53

<210> 8
15 <211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
20 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: RNA, die
einer Sequenz aus dem YFP-Gen entspricht

<400> 8
ucgagcugga cggcgacqua a 21

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Jcnl Application No
PCT/DE 00/00244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 A61K31/713

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 19732 A (GENSET) 12 November 1992 (1992-11-12)	1-29, 32-34, 37-43, 45-66, 69-71, 74-80, 82-102, 105-108, 112
Y	abstract, page 11 lines 18-28 pages 12-13, page 15 line 22 bis page 20 line 1, pages 33 and 46, figures 1-6	1-35, 37-43, 45-72, 74-80, 82-108, 110-112
	---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 June 2000

Date of mailing of the international search report

20/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gore, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No

PCT/DE 00/00244

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ; JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12 February 1998 (1998-02-12)	1-29, 32-34, 37-43, 45-66, 69-71, 74-80, 82-102, 105-108, 112
Y	abstract, pages 2-3	1-35, 37-43, 45-72, 74-80, 82-108, 110-112
X, P	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ; MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW () 1 July 1999 (1999-07-01))	1-29, 32-34, 37-43, 45-66, 69-71, 74-80, 82-102, 105-108, 112
Y	abstract, pages 6, 11-12, 15-17 ---	15-28, 52-65, 88-101
A	UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" CHEMICAL REVIEWS, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, vol. 90, no. 4, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 543-584, XP000141412 ISSN: 0009-2665 pages 558, 565-566, 574-575 ---	1-112
	MADHUR K. ET AL.: "Antisense RNA : function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 62, December 1998 (1998-12), pages 1415-1434, XP000909741 * pages 1422-1423 and 1428 *	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00244

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9219732 A	12-11-1992	FR	2675803 A	30-10-1992
		AU	660679 B	06-07-1995
		AU	1759692 A	21-12-1992
		CA	2102229 A	26-10-1992
		EP	0581848 A	09-02-1994
		JP	6506834 T	04-08-1994
WO 9805770 A	12-02-1998	DE	19631919 A	12-02-1998
		EP	0918853 A	02-06-1999
WO 9932619 A	01-07-1999	AU	1938099 A	12-07-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00244

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/11 A61K31/713

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 19732 A (GENSET) 12. November 1992 (1992-11-12)	1-29, 32-34, 37-43, 45-66, 69-71, 74-80, 82-102, 105-108, 112
Y	* Zusammenfassung, Seite 11 Z.18-28, Seiten 12-13, Seite 15 Z.22 bis Seite 20 Z.1, Seiten 33 und 46, Abbildungen 1-6 *	1-35, 37-43, 45-72, 74-80, 82-108, 110-112
	-----	-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

6. Juni 2000

20/06/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gore, V

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00244

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ; JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12. Februar 1998 (1998-02-12)	1-29, 32-34, 37-43, 45-66, 69-71, 74-80, 82-102, 105-108, 112
Y	* Zusammenfassung, Seiten 2-3 *	1-35, 37-43, 45-72, 74-80, 82-108, 110-112
X, P	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ; MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW ()) 1. Juli 1999 (1999-07-01)	1-29, 32-34, 37-43, 45-66, 69-71, 74-80, 82-102, 105-108, 112
Y	* Zusammenfassung, Seiten 6,11-12,15-17 *	15-28, 52-65, 88-101
A	UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" CHEMICAL REVIEWS, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, Bd. 90, Nr. 4, 1. Juni 1990 (1990-06-01), Seiten 543-584, XP000141412 ISSN: 0009-2665 * Seiten 558,565-566,574-575 *	1-112
	MADHUR K. ET AL.: "Antisense RNA : function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Bd. 62, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 1415-1434, XP000909741 Seiten 1422-1423 und 1428	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00244

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9219732 A	12-11-1992	FR	2675803 A	30-10-1992
		AU	660679 B	06-07-1995
		AU	1759692 A	21-12-1992
		CA	2102229 A	26-10-1992
		EP	0581848 A	09-02-1994
		JP	6506834 T	04-08-1994
WO 9805770 A	12-02-1998	DE	19631919 A	12-02-1998
		EP	0918853 A	02-06-1999
WO 9932619 A	01-07-1999	AU	1938099 A	12-07-1999

WO 00/44895
English Trans.

Method and medicament for inhibiting the expression of a given gene

The invention relates to methods in accordance with the preambles of claims 1 and 2. It furthermore relates to a medicament and to a use of double-stranded oligoribonucleotides and to a vector encoding them.

Such a method is known from WO 99/32619, which was unpublished at the priority date of the present invention. The known process aims at inhibiting the expression of genes in cells of invertebrates. To this end, the double-stranded oligoribonucleotide must exhibit a sequence which is identical with the target gene and which has a length of at least 50 bases. To achieve efficient inhibition, the identical sequence must be 300 to 1 000 base pairs in length. Such an oligoribonucleotide is complicated to prepare.

DE 196 31 919 C2 describes an antisense RNA with specific secondary structures, the antisense RNA being present in the form of a vector encoding it. The antisense RNA takes the form of an RNA molecule which is complementary to regions of the mRNA. Inhibition of the gene expression is caused by binding to these regions. This inhibition can be employed in particular for the diagnosis and/or therapy of diseases, for example tumor diseases or viral infections. - The disadvantage is that the antisense RNA must be introduced into the cell in an amount which is at least as high as the amount of the mRNA. The known antisense methods are not particularly effective.

US 5,712,257 discloses a medicament comprising mismatched double-stranded RNA (dsRNA) and bioactive mismatched fragments of dsRNA in the form of a ternary complex together with a surfactant. The dsRNA used for this purpose consists of synthetic nucleic acid single

strands without defined base sequence. The single strands undergo irregular base pairing, also known as "non-Watson-Crick" base pairing, giving rise to mismatched double strands. The known dsRNA is used to inhibit the amplification of retroviruses such as HIV. Amplification of the virus can be inhibited when non-sequence-specific dsRNA is introduced into the cells. This leads to the induction of interferon, which is intended to inhibit viral amplification. The inhibitory effect, or the activity, of this method is poor.

It is known from Fire, A. et al., NATURE, Vol. 391, pp. 806 that dsRNA whose one strand is complementary in segments to a nematode gene to be inhibited inhibits the expression of this gene highly efficiently. It is believed that the particular activity of the dsRNA used in nematode cells is not due to the antisense principle but possibly on catalytic properties of the dsRNA, or enzymes induced by it. Nothing is mentioned in this paper on the activity of specific dsRNA with regard to inhibiting the gene expression, in particular in mammalian and human cells.

The object of the present invention is to do away with the disadvantages of the prior art. In particular, it is intended to provide as effective as possible a method, medicament or use for the preparation of a medicament, which method, medicament or use is capable of causing particularly effective inhibition of the expression of a given target gene.

This object is achieved by the features of claims 1, 2, 37, 38 and 74 and 75. Advantageous embodiments can be seen from claims 3 to 36, 39 to 73 and 76 to 112.

In accordance with the method-oriented inventions, it is provided in each case that the region which is complementary to the target gene exhibits not more than

49 successive nucleotide pairs.

Provided in accordance with the invention are an oligoribonucleotide or a vector encoding therefor. At least segments of the oligoribonucleotide exhibit a defined nucleotide sequence. The defined segment may be limited to the complementary region I. However, it is also possible that all of the double-stranded oligoribonucleotide exhibits a defined nucleotide sequence.

Surprisingly, it has emerged that an effective inhibition of the expression of the target gene can be achieved even when the complementary region I is not more than 49 base pairs in length. The procedure of providing such oligoribonucleotides is less complicated.

In particular, dsRNA with a length of over 50 nucleotide pairs induces certain cellular mechanisms, for example the dsRNA-dependent protein kinase or the 2-5A system, in mammalian and human cells. This leads to the disappearance of the interference effect mediated by the dsRNA which exhibits a defined sequence. As a consequence, protein biosynthesis in the cell is blocked. The present invention overcomes this disadvantage in particular.

Furthermore, the uptake of dsRNA with short chain lengths into the cell or into the nucleus is facilitated markedly over longer-chain dsRNAs.

It has proved advantageous for the dsRNA or the vector to be present packaged into micellar structures, preferably in liposomes. The dsRNA or the vector can likewise be enclosed in viral natural capsids or in chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom. - The abovementioned

features make it possible to introduce the dsRNA or the vector into given target cells.

In a further aspect, the dsRNA has 10 to 1 000, preferably 15 to 49, base pairs. Thus, the dsRNA can be longer than the region I, which is complementary to the target gene. The complementary region I can be located at the terminus or inserted into the dsRNA. Such dsRNA or a vector provided for coding the same can be produced synthetically or enzymatically by customary methods.

The gene to be inhibited is expediently expressed in eukaryotic cells. The target gene can be selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id protein gene, developmental gene, prion gene. It can also be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia. It can be part of a virus or viroid which is preferably pathogenic to humans. - The method proposed makes it possible to produce compositions for the therapy of genetically determined diseases, for example cancer, viral diseases or Alzheimer's disease.

The virus or viroid can also be a virus or viroid which is pathogenic to animals or plant-pathogenic. In this case, the method according to the invention also permits the provision of compositions for treating animal or plant diseases.

In a further aspect, segments of the dsRNA are designed as double-stranded. A region II which is complementary within the double-stranded structure is formed by two separate RNA single strands or by autocomplementary regions of a topologically closed RNA single strand which is preferably in circular form.

The ends of the dsRNA can be modified to counteract degradation in the cell or dissociation into the single

strands. Dissociation takes place in particular when low concentrations or short chain lengths are used. To inhibit dissociation in a particularly effective fashion, the cohesion of the complementary region II, which is caused by the nucleotide pairs, can be increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s). - A dsRNA according to the invention whose dissociation is reduced exhibits greater stability to enzymatic and chemical degradation in the cell or in the organism.

The complementary region II can be formed by autocomplementary regions of an RNA hairpin loop, in particular when using a vector according to the invention. To afford protection from degradation, it is expedient for the nucleotides to be chemically modified in the loop region between the double-stranded structure.

The chemical linkage is expediently formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination. In an especially advantageous aspect, it can be formed at at least one, preferably both, end(s) of the complementary region II.

It has furthermore proved to be advantageous for the chemical linkage to be formed by one or more linkage groups, the linkage groups preferably being poly (oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains. The chemical linkage can also be formed by purine analogs used in place of purines in the complementary regions II. It is also advantageous for the chemical linkage to be formed by azabenzene units introduced into the complementary regions II. Moreover, it can be formed by branched nucleotide analogs used in place of nucleotides in the complementary regions II.

It has proved expedient to use at least one of the following groups for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl) cystamine; 4-thiouracil; psoralene. The chemical linkage can furthermore be formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded region. The chemical linkage at the ends of the double-stranded region is preferably formed by triple-helix bonds.

The chemical linkage can expediently be induced by ultraviolet light.

The nucleotides of the dsRNA can be modified. This counteracts the activation, in the cell, of a double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR.

Advantageously, at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the complementary region II is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group. At least one nucleotide in at least one strand of the complementary region II can also be a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C methylene bridge. Advantageously, several nucleotides are locked nucleotides.

A further especially advantageous embodiment provides that the dsRNA or the vector is bound to, associated with or surrounded by, at least one viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically. The coat protein can be derived from polyomavirus. The coat protein can contain the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2). The use of such coat proteins is known from, for example, DE 196 18 797 A1, whose disclosure is herewith incorporated. - The

abovementioned features considerably facilitate the introduction of the dsRNA or of the vector into the cell.

When a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, one side preferably faces the interior of the capsid or capsid-type structure. The construct formed is particularly stable.

The dsRNA can be complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene. - The cell can be a vertebrate cell or a human cell.

At least two dsRNAs which differ from each other or at least one vector encoding them can be introduced into the cell, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes. This makes it possible simultaneously to inhibit the expression of at least two different target genes. In order to suppress, in the cell, the expression of a double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR, one of the target genes is advantageously the PKR gene. This allows effective suppression of the PKR activity in the cell.

The invention furthermore provides a medicament with at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene. - Surprisingly, it has emerged that such a dsRNA is suitable as medicament for inhibiting the expression of a given gene in mammalian cells. In comparison with the use of single-stranded oligoribonucleotides, the inhibition is already caused at concentrations which are lower by at least one order of magnitude. The medicament according to the invention is highly effective. Lesser side effects can be

expected.

The invention furthermore provides a medicament with at least one vector for coding at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene. - The medicament proposed exhibits the abovementioned advantages. By using a vector, in particular production costs can be reduced.

In a particularly advantageous embodiment, the complementary region I has not more than 49 successive nucleotide pairs. - Surprisingly, it has emerged that an effective inhibition of the expression of the target gene can be achieved even when the complementary region I is not more than 49 base pairs in length. The procedure of providing such oligoribonucleotides is less complicated.

The invention furthermore provides a use of an oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) for preparing a medicament for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene. - Surprisingly, such a dsRNA is suitable for preparing a medicament for inhibiting the expression of a given gene. Compared with the use of single-stranded oligoribonucleotides, the inhibition is already caused at concentrations which are lower by one order of magnitude when using dsRNA. The use according to the invention thus makes possible the preparation of particularly effective medicaments.

The invention furthermore provides the use of a vector for coding at least one oligoribonucleotide with

double-stranded structure (dsRNA) for preparing a medicament for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to this target gene. - The use of a vector makes possible a particularly effective gene therapy.

With regard to advantageous embodiments of the medicament and of the use, reference is made to the description of the above features.

Use examples of the invention are illustrated in greater detail hereinbelow with reference to the figures, in which:

Fig. 1 shows the schematic representation of a plasmid for the in vitro transcription with T7- and SP6-polymerase,

Fig. 2 shows RNA following electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel and staining with ethidium bromide,

Fig. 3 shows a representation of radioactive RNA transcripts following electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel with 7 M urea by means of an instant imager, and

Figs. 4a - e show Texas Red and YFP fluorescence in murine fibroblasts.

Use example 1:

The inhibition of transcription was detected by means of sequence homologous dsRNA in an in vitro transcription system with a nuclear extract from human HeLa cells. The DNA template for this experiment was plasmid pCMV1200 which had been linearized by means of *Bam*HI.

Generation of the template plasmids:

The plasmid shown in fig. 1 was constructed for use in the enzymatic synthesis of the dsRNA. To this end, a polymerase chain reaction (PCR) with the "positive control DNA" of the HelaScribe[®] Nuclear Extract in vitro transcription kit by Promega, Madison, USA, as DNA template was first carried out. One of the primers used contained the sequence of an EcoRI cleavage site and of the T7 RNA polymerase promoter as shown in sequence listing No. 1. The other primer contained the sequence of a BamHI cleavage site and of the SP6 RNA polymerase promoter as shown in sequence listing No. 2. In addition, the two primers had, at the 3' ends, regions which were identical with or complementary to the DNA template. The PCR was carried out by means of the "Tag PCR Core Kits" by Qiagen, Hilden, Germany, following the manufacturer's instructions. 1.5 mM MgCl₂, in each case 200 µM dNTP, in each case 0.5 µM primer, 2.5 U Tag DNA polymerase and approximately 100 ng of "positive control DNA" were employed as template in PCR buffer in a volume of 100 µl. After initial denaturation of the template DNA by heating for 5 minutes at 94°C, amplification was carried out in 30 cycles of denaturation for in each case 60 seconds at 94°C, annealing for 60 seconds at 5°C below the calculated melting point of the primers and polymerization for 1.5-2 minutes at 72°C. After a final polymerization of 5 minutes at 72°C, 5 µl of the reaction were analyzed by agarose-gel electrophoresis. The length of the DNA fragment amplified thus was 400 base pairs, 340 base pairs corresponding to the "positive control DNA". The PCR product was purified, hydrolyzed with EcoRI and BamHI and, after repurification, employed in the ligation together with a pUC18 vector which had also been hydrolyzed by EcoRI and BamHI. *E. coli* XL1-blue was then transformed. The plasmid obtained (pCMV5) carries a DNA fragment whose

5' end is flanked by the T7 promoter and whose 3' end is flanked by the SP6 promoter. By linearizing the plasmid with BamHI, it can be employed *in vitro* with the T7-RNA polymerase for the run-off transcription of a single-stranded RNA which is 340 nucleotides in length and shown in sequence listing No. 3. If the plasmid is linearized with EcoRI, it can be employed for the run-off transcription with SP6 RNA polymerase, giving rise to the complementary strand. In accordance with the method outlined hereinabove, an RNA 23 nucleotides in length was also synthesized. To this end, a DNA shown in sequence listing No. 4 was ligated with the pUC18 vector via the EcoRI and BamHI cleavage sites.

Plasmid pCMV1200 was constructed as DNA template for the *in-vitro* transcription with HeLa nuclear extract. To this end, a 1 191 bp EcoRI/BamHI fragment of the positive control DNA contained in the HeLaScribe[®] Nuclear Extract *in vitro* transcription kit was amplified by means of PCR. The amplified fragment encompasses the 828 bp "immediate early" CMV promoter and a 363 bp transcribable DNA fragment. The PCR product was ligated to the vector pGEM-T via "T-overhang" ligation. A BamHI cleavage site is located at the 5' end of the fragment. The plasmid was linearized by hydrolysis with BamHI and used as template in the run-off transcription.

In-vitro transcription of the complementary single strands:

PCMVS plasmid DNA was linearized with EcoRI or BamHI. It was used as DNA template for an *in-vitro* transcription of the complementary RNA single strands with SP6 and T7 RNA polymerase, respectively. The "Riboprobe *in vitro* Transcription" system by Promega, Madison, USA, was employed for this purpose. Following the manufacturer's instructions, 2 μ g of linearized

plasmid DNA were incubated in 100 μ l of transcription buffer and 40 U T7 or SP6 RNA polymerase for 5-6 hours at 37°C. The DNA template was subsequently degraded by addition of 2.5 μ l of RNase-free DNase RQ1 and incubation for 30 minutes at 37°C. The transcription reaction was made up to 300 μ l with H₂O and purified by phenol extraction. The RNA was precipitated by addition of 150 μ l of 7 M ammonium acatate [sic] and 1 125 μ l of ethanol and stored at -65°C until used for the hybridization.

Generation of the RNA double strands:

For the hybridization, 500 μ l of the single-stranded RNA which had been stored in ethanol and precipitated were spun down. The resulting pellet was dried and taken up in 30 μ l of PIPES buffer, pH 6.4 in the presence of 80% formamide, 400 mM NaCl and 1 mM EDTA. In each case 15 μ l of the complementary single strands were combined and heated for 10 minutes at 85°C. The reactions were subsequently incubated overnight at 50°C and cooled to room temperature.

Only approximately equimolar amounts of the two single strands were employed in the hybridization. This is why the dsRNA preparations contained single-stranded RNA (ssRNA) as contaminant. In order to remove these ssRNA contaminants, the reactions were treated, after hybridization, with the single-strand-specific ribonucleases bovine pancreatic RNase A and *Aspergillus oryzae* RNase T1. RNase A is an endoribonuclease which is specific for pyrimidines. RNase T1 is an endoribonuclease which preferentially cleaves at the 3' side of guanosines. dsRNA is no substrate for these ribonucleases. For the RNase treatment, the reactions in 300 μ l of Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl and 5 mM EDTA were treated with 1.2 μ l of RNaseA at a concentration of 10 mg/ml and 2 μ l of RNaseT1 at a concentration of 290 μ g/ml. The reactions were incubated for 1.5 hours

at 30°C. Thereupon, the RNases were denatured by addition of 5 μ l of proteinase K at a concentration of 20 mg/ml and 10 μ l of 20% SDS and incubation for 30 minutes at 37°C. The dsRNA was purified by phenol extraction and precipitated with ethanol. To verify the completeness of the RNase digestion, two control reactions were treated with ssRNA analogously to the hybridization reactions.

The dried pellet was taken up in 15 μ l of TE buffer, pH 6.5, and subjected to native polyacrylamide gel electrophoresis on an 8% gel. The acrylamide gel was subsequently stained in an ethidium bromide solution and washed in a water bath. Fig. 2 shows the RNA which had been visualized in a UV transilluminator. The sense RNA which had been applied to lane 1 and the antisense RNA which had been applied to lane 2 showed a different migration behavior under the chosen conditions than the dsRNA of the hybridization reaction which had been applied to lane 3. The RNase-treated sense RNA and antisense RNA which had been applied to lanes 4 and 5, respectively, produced no visible band. This shows that the single-stranded RNAs had been degraded completely. The RNase-treated dsRNA of the hybridization reaction which had been applied to lane 6 is resistant to RNase treatment. The band which migrates faster in the native gel in comparison with the dsRNA applied to lane 3 results from dsRNA which is free from ssRNA. In addition to the dominant main band, weaker bands which migrate faster are observed after the RNase treatment.

In-vitro transcription test with human nuclear extract:
Using the HeLaScribe[®] Nuclear Extract in vitro transcription kit by Promega, Madison, USA, the transcription efficiency of the abovementioned DNA fragment which is present in plasmid pCMV1200 and homologous to the "positive control DNA" was determined in the presence of the dsRNA (dsRNA-CMV5) with sequence

homology. Also, the effect of the dsRNA without sequence homology, which corresponds to the yellow fluorescent protein (YFP) gene (dsRNA-YFP), was studied. This dsRNA had been generated analogously to the dsRNA with sequence homology. The sequence of a strand of this dsRNA can be found in sequence listing No. 5. Plasmid pCMV1200 was used as template for the run-off transcription. It carries the "immediate early" cytomegalovirus promoter which is recognized by the eukaryotic RNA polymerase II, and a transcribable DNA fragment. Transcription was carried out by means of the HeLa nuclear extract, which contains all the proteins which are necessary for transcription. By addition of [α - 32 P]rGTP to the transcription reaction, radiolabeled transcript was obtained. The [α - 32 P]rGTP used had a specific activity of 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. 3 mM MgCl₂, in each case 400 μ M rATP, rCTP, rUTP, 16 μ M rGTP, 0.4 μ M [α - 32 P]rGTP and depending on the experiment 1 fmol of linearized plasmid DNA and various amounts of dsRNA in transcription buffer were employed per reaction. Each batch was made up to a volume of 8.5 μ l with H₂O. The reactions were mixed carefully. To start the transcription, 4 U HeLa nuclear extract in a volume of 4 μ l were added and incubated for 60 minutes at 30° C. The reaction was stopped by addition of 87.5 μ l of quench mix which had been warmed to 30° C. To remove the proteins, the reactions were treated with 100 μ l of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v) saturated with TE buffer, pH 5.0, and the reactions were mixed vigorously for 1 minute. For phase separation, the reactions were spun for approximately 1 minute at 12 000 rpm and the top phase was transferred into a fresh reaction vessel. Each reaction was treated with 250 μ l of ethanol. The reactions were mixed thoroughly and incubated for at least 15 minutes on dry ice/methanol. To precipitate the RNA, the reactions were spun for 20 minutes at 12 000 rpm and 40° C. The supernatant was discarded. The pellet was dried in

vacuo for 15 minutes and resuspended in 10 μ l of H₂O. Each reaction was treated with 10 μ l of denaturing loading buffer. The free GTP was separated from the transcript formed by means of denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on an 8% gel with 7 M urea. The RNA transcripts formed upon transcription with HeLa nuclear extract, in denaturing loading buffer, were heated for 10 minutes at 90°C and 10 μ l aliquots were applied immediately to the freshly washed pockets. The electrophoresis was run at 40 mA. The amount of the radioactive ssRNA formed upon transcription was analyzed after electrophoresis with the aid of an Instant Imager.

Fig. 3 shows the radioactive RNA from a representative test, shown by means of the Instant Imager. Samples obtained from the following transcription reactions were applied:

Lane 1: without template DNA, without dsRNA;
Lane 1: 50 ng of template DNA, without dsRNA;
Lane 3: 50 ng of template DNA, 0.5 μ g of dsRNA YFP;
Lane 4: 50 ng of template DNA, 1.5 μ g of dsRNA YFP;
Lane 5: 50 ng of template DNA, 3 μ g of dsRNA YFP;
Lane 6: 50 ng of template DNA, 5 μ g of dsRNA YFP;
Lane 7: without template DNA, 1.5 dsRNA YFP;
Lane 8: 50 ng of template DNA, without dsRNA;
Lane 9: 50 ng of template DNA, 0.5 μ g of dsRNA CMV5;
Lane 10: 50 ng of template DNA, 1.5 μ g of dsRNA CMV5;
Lane 11: 50 ng of template DNA, 3 μ g of dsRNA CMV5;
Lane 12: 50 ng of template DNA, 5 μ g of dsRNA CMV5;

It emerged that the amount of transcript was reduced markedly in the presence of dsRNA with sequence homology in comparison with the control reaction without dsRNA and with the reactions with dsRNA YFP without sequence homology. The positive control in lane 2 shows that radioactive transcript was formed upon the

in-vitro transcription with HeLa nuclear extract. The reaction is used for comparison with the transcription reactions which had been incubated in the presence of dsRNA. Lanes 3 to 6 show that the addition of non-sequentially-specific dsRNA YFP had no effect on the amount of transcript formed. Lanes 9 to 12 show that the addition of an amount of between 1.5 and 3 μ g of sequentially-specific dsRNA CMV5 leads to a reduction in the amount of transcript formed. In order to exclude that the effects observed are based not on the dsRNA but on any contamination which might have been carried along accidentally during the preparation of the dsRNA, a further control was carried out. Single-stranded RNA was transcribed as described above and subsequently subjected to the RNase treatment. It was demonstrated by means of native polyacrylamide gel electrophoresis that the ssRNA had been degraded completely. This reaction was subjected to phenol extraction and ethanol precipitation and subsequently taken up in PE buffer, as were the hybridization reactions. This gave a sample which contained no RNA but had been treated with the same enzymes and buffers as the dsRNA. Lane 8 shows that the addition of this sample had no effect on transcription. The reduction of the transcript upon addition of sequence-specific dsRNA can therefore be ascribed unequivocally to the dsRNA itself. The reduction of the amount of transcript of a gene in the presence of dsRNA in a human transcription system indicates an inhibition of the expression of the gene in question. This effect can be attributed to a novel mechanism caused by the dsRNA.

Use example 2:

The test system used for these in-vivo experiments was the murine fibroblast cell line NIH3T3, ATCC CRL-1658. The YFP gene was introduced into the nuclei with the aid of microinjection. Expression of YFP was studied under the effect of simultaneously cotransfected dsRNA

with sequence homology. This dsRNA YFP shows homology with the 5'-region of the YFP gene over a length of 315 bp. The nucleotide sequence of a strand of the dsRNA YFP is shown in sequence listing No. 5. Evaluation under the fluorescence microscope was carried out 3 hours after injection with reference to the greenish-yellow fluorescence of the YFP formed.

Construction of the template plasmid, and preparation of the dsRNA:

A plasmid was constructed following the same principle as described in use example 1 to act as template for the production of the YFP dsRNA by means of T7 and SP6 in-vitro transcription. Using the primer Eco_T7_YFP as shown in sequence listing No. 6 and Bam_SP6_YFP as shown in sequence listing No. 7, the desired gene fragment was amplified by PCR and used analogously to the above description for preparing the dsRNA. The dsRNA YFP obtained is identical to the dsRNA used in use example 1 as non-sequence-specific control.

A dsRNA linked chemically at the 3' end of the RNA as shown in sequence listing No. 8 to the 5' end of the complementary RNA via a C18 linker group was prepared (L-dsRNA). To this end, synthons modified by disulfide bridges were used. The 3'-terminal synthon is bound to the solid support via the 3' carbon with an aliphatic linker group via a disulfide bridge. In the 5'-terminal synthon of the complementary oligoribonucleotide which is complementary to the 3'-terminal synthon of the one oligoribonucleotide, the 5'-trityl protecting group is bound via a further aliphatic linker and a disulfide bridge. Following synthesis of the two single strands, removal of the protecting groups and hybridization of the complementary oligoribonucleotides, the thiol groups which form are brought into spatial vicinity. The single strands are linked to each other by oxidation via their aliphatic linkers and a disulfide

bridge. This is followed by purification with the aid of HPLC.

Preparation of the cell cultures:

The cells were incubated in DMEM supplemented with 4.5 g/l glucose, 10% fetal bovine serum in culture dishes at 37°C under a 7.5% CO₂ atmosphere and passaged before reaching confluence. The cells were detached with trypsin/EDTA. To prepare for microinjection, the cells were transferred into Petri dishes and incubated further until microcolonies formed.

Microinjection:

For the microinjection, the culture dishes were removed from the incubator for approximately 10 minutes. Approximately 50 nuclei were injected singly per reaction within a marked area using the AIS microinjection system from Carl Zeiss, Göttingen, Germany. The cells were subsequently incubated for three more hours. For the microinjection, borosilicate glass capillaries from Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany, with a diameter of less than 0.5 µm at the tip were prepared. The microinjection was carried out using a micromanipulator from Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan. The injection time was 0.8 seconds and the pressure was approximately 100 hPa. The transfection was carried out using the plasmid pCDNA YFP, which contains an approximately 800 bp BamHI/EcoRI fragment with the YFP gene in vector pcDNA3. The samples injected into the nuclei contained 0.01 µg/µl of pCDNA-YFP and Texas Red coupled to dextran-70000 in 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KPO₄ [sic], pH 7.5. Approximately 100 pl of RNA with a concentration of 1 µM or, in the case of the L-dsRNA, 375 µM were additionally added.

The cells were studied under a fluorescence microscope with excitation with the light of the excitation

wavelength of Texas Red, 568 nm, or of YFP, 488 nm. Individual cells were documented by means of a digital cameras. Figures 4a-e show the result for NIH3T3 cells. In the cells shown in Fig. 4a, sense-YFP-ssRNA has been injected, in Fig. 4b antisense-YFP-ssRNA, in Fig. 4c dsRNA-YFP, in Fig. 4d no RNA and in Fig. 4e L-dsRNA.

The field on the left shows in each case the fluorescence of cells with excitation at 568 nm. The fluorescence of the same cells at an excitation of 488 nm is seen on the right. The Texas Red fluorescence of all the cells shown demonstrates that the injection solution had been applied successfully into the nuclei and that cells with successful hits were still alive after three hours. Dead cells no longer showed Texas Red fluorescence.

The right fields of each of figures 4a and 4b show that YFP expression was not visibly inhibited when the single-stranded RNA was injected into the nuclei. The right field of Fig. 4c shows cells whose YFP fluorescence was no longer detectable after the injection of dsRNA-YFP. Fig. 4d shows cells into which no RNA had been injected, as control. The cell shown in fig. 4e shows YFP fluorescence which can no longer be detected owing to the injection of the L-dsRNA, which shows regions with sequence homology to the YFP gene. This result demonstrates that even shorter dsRNAs can be used for specifically inhibiting gene expression in mammals when the double strands are stabilized by chemically linking the single strands.

Patent Claims

1. Method for inhibiting the expression of a given target gene in a cell where an oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) is introduced into the cell, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene,

characterized in that
the region I which is complementary to the target
gene has not more than 49 successive nucleotide
pairs.

2. Method for inhibiting the expression of a given target gene in a cell, where a vector for coding for at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) is introduced into the cell, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene,
characterized in that
the region I which is complementary to the target gene has not more than 49 successive nucleotide pairs.
3. Method according to claim 1 or 2, where the dsRNA or the vector are enclosed by micellar structures, preferably by liposomes.
4. Method according to one of the preceding claims, where the dsRNA or the vector is enclosed by natural viral capsids or by chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom.
5. Method according to one of the preceding claims, where the dsRNA has 10 to 1 000, preferably 15 to 49, base pairs.
6. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is expressed in eukaryotic cells.
7. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-

protein gene, development gene, prion gene.

8. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmidia.
9. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is part of a virus or viroid.
10. Method according to claim 9, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.
11. Method according to claim 9, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or phytopathogenic.
12. Method according to one of the preceding claims, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
13. Method according to one of the preceding claims, where a region II which is complementary within the double-stranded structure is formed by two separate RNA single strands or by autocomplementary regions of a topologically closed RNA single strand which is preferably in circular form.
14. Method according to one of the preceding claims, where the complementary region II is formed by autocomplementary regions of an RNA hairpin loop.
15. Method according to one of the preceding claims, where the nucleotides are chemically modified in the loop region between the double-stranded structure to afford protection from degradation.

16. Method according to one of the preceding claims, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
17. Method according to one of the preceding claims, where the cohesion of the complementary region II, which is caused by the nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s).
18. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
19. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the complementary region II.
20. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
21. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the complementary regions II in the place of purines.
22. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by azabenzene units introduced into the complementary regions II.

23. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the complementary regions II in the place of nucleotides.
24. Method according to one of the preceding claims, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
25. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded region.
26. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage at the ends of the double-stranded region is formed by triple-helix bonds.
27. Method according to one of the preceding claims, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the complementary region II is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
28. Method according to one of the preceding claims, where at least one nucleotide in at least one strand of the complementary region II is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
29. Method according to one of the preceding claims, where the dsRNA or the vector is bound to, associated with or surrounded by, at least one

viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically.

30. Method according to one of the preceding claims, where the coat protein is derived from polyomavirus.
31. Method according to one of the preceding claims, where the coat protein contains the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2).
32. Method according to one of the preceding claims, where, when a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-type structure.
33. Method according to one of the preceding claims, where the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
34. Method according to one of the preceding claims, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.
35. Method according to one of the preceding claims, where at least two dsRNAs which differ from each other or at least one vector encoding them are introduced into the cell, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
36. Method according to one of the preceding claims, where one of the target genes is the PKR gene.
37. Medicament with at least one oligoribonucleotide

with double-stranded structure (dsRNA) for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene.

38. Medicament with at least one vector for encoding at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene.
39. Medicament according to claim 37 or 38, where the dsRNA on the vector is enclosed by micellar structures, preferably by liposomes.
40. Medicament according to claim 37 or 38, where the dsRNA or the vector is enclosed by natural viral capsids or by chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom.
41. Medicament according to one of claims 37 to 40, where dsRNA has 10 to 1 000, preferably 15 to 49, base pairs.
42. Medicament according to one of claims 37 to 41, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
43. Medicament according to one of claims 37 to 42, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
44. Medicament according to one of claims 37 to 43, where the target gene can be expressed in

pathogenic organisms, preferably in plasmidia.

45. Medicament according to one of claims 37 to 44, where the target gene is part of a virus or viroid.
46. Medicament according to claim 45, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.
47. Medicament according to claim 45, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or plant-pathogenic.
48. Medicament according to one of claims 37 to 47, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
49. Medicament according to one of claims 37 to 48, where the complementary region I has not more than 49 successive nucleotides.
50. Medicament according to one of claims 37 to 49, where a region II which is complementary within the double-stranded structure is formed by two separate RNA single strands or by autocomplementary regions of a topologically closed RNA single strand which is preferably in circular form.
51. Medicament according to one of claims 37 to 50, where the complementary region II is formed by autocomplementary regions of an RNA hairpin loop.
52. Medicament according to one of claims 37 to 51, where the nucleotides are chemically modified in the loop region between the double-stranded

structure to afford protection from degradation.

53. Medicament according to one of claims 37 to 52, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
54. Medicament according to one of claims 37 to 53, where the cohesion of the complementary region II, which is caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s).
55. Medicament according to one of claims 37 to 54, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
56. Medicament according to one of claims 37 to 55, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the complementary region II.
57. Medicament according to one of claims 37 to 56, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
58. Medicament according to one of claims 37 to 57, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the complementary regions II in the place of purines.
59. Medicament according to one of claims 37 to 58, where the chemical linkage is formed by azabenzene units inserted into the complementary regions II.

60. Medicament according to one of claims 37 to 59, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the complementary regions II in the place of nucleotides.
61. Medicament according to one of claims 37 to 60, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage; methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
62. Medicament according to one of claims 37 to 61, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded region.
63. Medicament according to one of claims 37 to 62, where the chemical linkage are [sic] triple-helix bonds provided at the ends of the double-stranded structure.
64. Medicament according to one of claims 37 to 63, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the complementary region II is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
65. Medicament according to one of claims 37 to 64, where at least one nucleotide in at least one strand of the complementary region II is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
66. Medicament according to one of claims 37 to 65, where the dsRNA or the vector is bound to,

associated with or surrounded by, at least one viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically.

67. Medicament according to one of claims 37 to 66, where the coat protein is derived from the polyomavirus.
68. Medicament according to one of claims 37 to 67, where the coat protein contains the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2).
69. Medicament according to one of claims 37 to 68, where, when a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-type structure.
70. Medicament according to one of claims 37 to 69, where the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
71. Medicament according to one of claims 37 to 70, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.
72. Medicament according to one of claims 37 to 71, where at least two dsRNAs which differ from each other or a vector encoding them are contained in the medicament, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
73. Medicament according to claim 72, where one of the target genes is the PKR gene.
74. Use of an oligoribonucleotide with double-stranded

structure (dsRNA) for preparing a medicament for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene.

75. Use of a vector for encoding at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) for preparing a medicament for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region I where at least segments are complementary to the target gene.
76. Use according to claim 74 or 75, where the dsRNA or the vector is enclosed by micellar structures, preferably by liposomes.
77. Use according to claim 74 or 75, where the dsRNA or the vector is enclosed by natural viral capsids or by chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom.
78. Use according to one of claims 74 to 77, where dsRNA has 10 to 1 000, preferably 15 to 49, base pairs.
79. Use according to one of claims 74 to 78, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
80. Use according to one of claims 74 to 79, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
81. Use according to one of claims 74 to 80, where the target gene can be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

82. Use according to one of claims 74 to 81, where the target gene is part of a virus or viroid.
83. Use according to claim 82, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.
84. Use according to claim 82, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or plant-pathogenic.
85. Use according to one of claims 74 to 84, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
86. Use according to one of claims 74 to 85, where a region II which is complementary within the double-stranded structure is formed by two separate RNA single strands or by autocomplementary regions of a topologically closed RNA single strand which is preferably in circular form.
87. Use according to one of claims 74 to 86, where the complementary region II is formed by autocomplementary regions of an RNA hairpin loop.
88. Use according to one of claims 74 to 87, where the nucleotides are chemically modified in the loop region between the double-stranded structure to afford protection from degradation.
89. Use according to one of claims 74 to 88, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
90. Use according to one of claims 74 to 89, where the cohesion of the complementary region II, which is

caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s).

91. Use according to one of claims 74 to 90, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
92. Use according to one of claims 74 to 91, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the complementary region II.
93. Use according to one of claims 74 to 92, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
94. Use according to one of claims 74 to 93, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the complementary regions II in the place of purines.
95. Use according to one of claims 74 to 94, where the chemical linkage is formed by azabenzeno units introduced into the complementary regions II.
96. Use according to one of claims 74 to 95, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the complementary regions II in the place of nucleotides.
97. Use according to one of claims 74 to 96, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue;

bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.

98. Use according to one of claims 74 to 97, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups attached to the ends of the double-stranded region.
99. Use according to one of claims 74 to 98, where the chemical linkage at the ends of the double-stranded region is formed by triple-helix bonds.
100. Use according to one of claims 74 to 99, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the complementary region II is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
101. Use according to one of claims 74 to 100, where at least one nucleotide in at least one strand of the complementary region II is a locked nucleotide, with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
102. Use according to one of claims 74 to 101, where the dsRNA or the vector is bound to, associated with or surrounded by, at least one viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically.
103. Use according to one of claims 74 to 102, where the coat protein is derived from polyomavirus.
104. Use according to one of claims 74 to 103, where the coat protein contains the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2).

105. Use according to one of claims 74 to 104, where, when a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-type structure.
106. Use according to one of claims 74 to 105, where the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
107. Use according to one of claims 74 to 106, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.
108. Use according to one of claims 74 to 107, where at least two dsRNAs which differ from each other or at least one vector encoding them are used, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
109. Use according to claim 108, where one of the target genes is the PKR gene.
110. Use according to one of claims 74 to 109, where the medicament is injectable into the bloodstream or into the interstitium of the organism to undergo therapy.
111. Use according to one of claims 74 to 110, where the dsRNA or the vector encoding it are taken up into bacteria or microorganisms.
112. Use according to one of claims 74 to 111, where the complementary region I has not more than 49 successive nucleotide pairs.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.